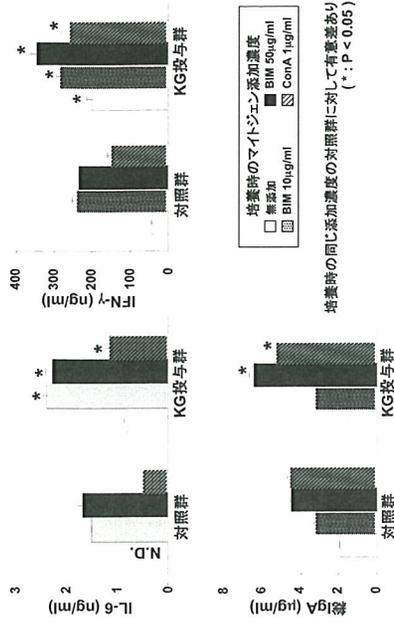


(* : 対照と比較して有意差あり p<0.05)

図4. 処理条件の異なる*Bifidobacterium*菌体成分をマウスに7日間経口投与したときのパイエル板細胞応答に与える影響



培養時のマイトジェン添加濃度
 BIM 50ug/ml
 BIM 10ug/ml
 ConA 1ug/ml

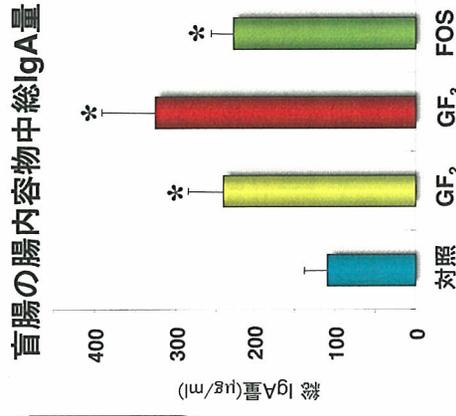
図5. 発酵乳成分を1週間マウスに経口投与したときの

パイエル板細胞応答に与える影響

- FOS (GF₂ (~45%) および GF₃ (~45%) を含む)
- GF₂
- GF₃
- 対照



7.5%配合実験食を4週間給餌後、免疫系細胞応答 (IgA, サイトカイン産生など) を評価



対照群に対して有意差あり (*: P<0.05)

図7. 難消化性オリゴ糖類のマウス経口投与による腸管内総IgA量に与える影響

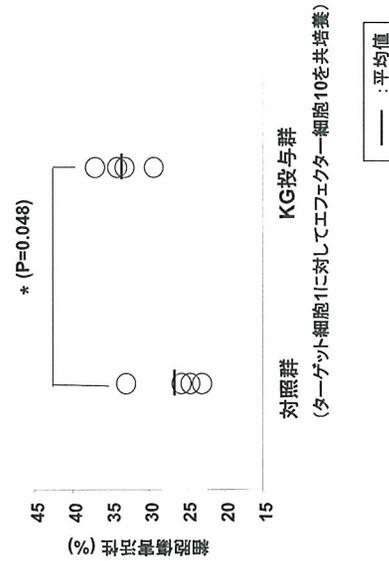
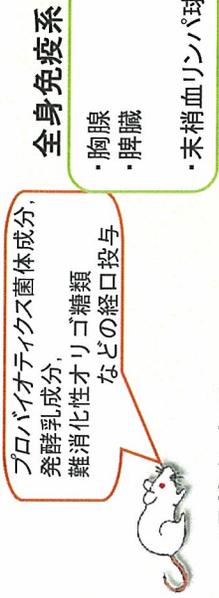


図6. 発酵乳成分を1週間マウスに経口投与したときの

末梢血単核球のNK活性に与える影響

抗感染食品の動物実験評価法



- 抗体産生
- サイトカイン産生
- 細胞増殖活性
- NK活性
- (細胞傷害活性)
- 感染実験

免疫調節機能をもつ食品のスクリーニングや作用量の評価、作用機序解明に有効

ヒト試験とを合わせた総合的評価の必要性あり



- IgA抗体産生
- サイトカイン産生
- 細胞増殖活性
- 免疫関連遺伝子

図9. いわゆる健康食品の免疫調節機能・アレルギー予防の評価法

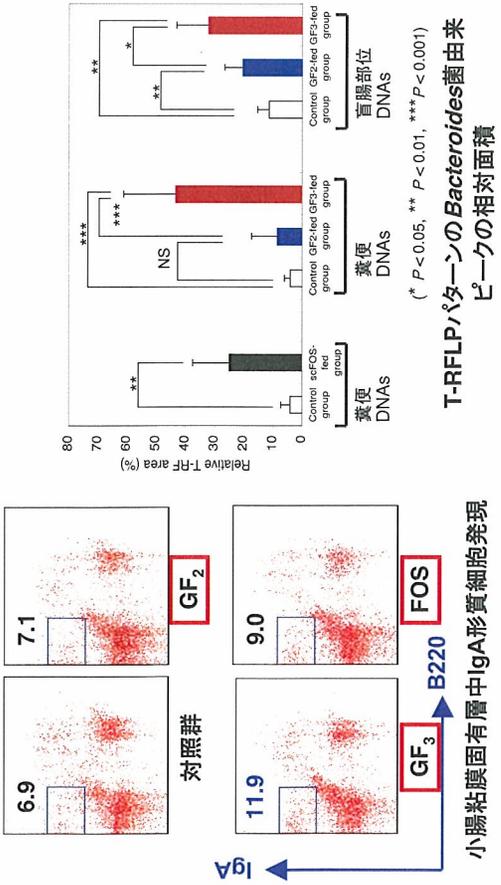


図8. 難消化性オリゴ糖類のマウス経口投与による腸粘膜固有層のIgA形質細胞の発現と腸内細菌叢(Bacteroides)におよぼす影響

を生菌体、超音波破碎処理、凍結乾燥処理、加熱処理（85-90°C、30 分間）という処理条件の異なる菌体成分についてマウスに経口投与したところ、いずれも PP 細胞の総 IgA 産生、IFN- γ 産生が増加することが明らかとなった（図 4）。

b) 発酵乳成分のマウス経口投与による免疫調節作用についての評価

ケフィア関連成分（KG）の経口投与によって腸内容物中の総 IgA 量には影響はみられなかったが、PP 細胞（図 5）の IgA 産生および IL-6、IFN- γ 産生、SPL 細胞（データ掲載なし）の IFN- γ 、IL-12 産生量の亢進が認められた。さらに、末梢血単核細胞（PBMC）の NK 活性が有意に増強された（図 6）。

c) 難消化性オリゴ糖類をマウスに経口投与したときの免疫調節作用についての評価

FOS および FOS を構成している主要な構成糖である GF2 および GF3 の 4 週間のマウス経口投与によって、腸内容物中の総 IgA 量が有意に増加し（図 7）、特に腸粘膜固有層中の IgA 形質細胞の発現が亢進することが明らかとなった。このとき、マウス腸内細菌叢に対する影響はこれらの難消化性オリゴ糖類の経口投与によって変化することが明らかになり、特に *Bacteroides* の増加が特徴的であった。一方、このオリゴ糖類による免疫系への作用は、免疫系細胞に対する細胞増殖・抗体産生などの直接的な作用はあまりみられなかったことから（データ掲載なし）、腸内細菌叢の変化によるものと考えられる（図 8）。

D. 考察

本研究では、特に抗感染作用が期待される食品成分のスクリーニングやその作用機序を解明する評価方法について、特に実験動物を用いた検討を行った。

プロバイオティクスとして生体への免疫調節作用が期待される菌体成分 *Bifidobacterium pseudocatenulatum* 7041 (Bp) 菌体は、マウスに経口投与することによって、主に小腸部位においてはパイエル板および粘膜固有層に取り込まれ、循環帰巣経路を介して腸間膜リンパ節に到達することが推察された。特に、小腸パイエル板において

は M 細胞から抗原の取り込みが比較的容易に起こることが知られており、この経口投与された Bp 菌体についてもパイエル板の M 細胞より取り込まれていることが考えられ、この組織に存在する CD11c⁺細胞（樹状細胞など）に取り込まれて免疫応答を感作していることが示唆された。実際に Bp 菌体経口摂取後 24 時間のマウスパイエル板細胞は、免疫学的な感作後、比較的早い時間に応答がみられる IL-12 p40 産生が有意に亢進し、樹状細胞などの自然免疫系が直接応答したことが推察された。したがって、食品として摂取されたプロバイオティクス菌体成分が、腸管関連リンパ組織に到達して、直接、免疫系応答を修飾していることが示唆された。さらに、7 日間の連続経口摂取によってもこのプロバイオティクス菌体成分は IgA 抗体産生に関与する応答を活性化したことから、病原細菌等による感染防御に対して有効であるかもしれない。現在、我々は感染試験による詳細な検討を継続して進めている。さらに、プロバイオティクス菌体成分と同様に、他の食品成分（発酵乳成分、難消化性オリゴ糖類など）による免疫調節作用についても腸管免疫系における IgA 産生の誘導、および全身免疫系における細胞傷害活性を活性化する作用が用量に依存した免疫応答としてみられ（データ掲載なし）、宿主の感染防御に対してこれらの食品成分が有効に作用している可能性が示唆された。

したがって、本評価方法は動物実験によって、抗感染作用が期待される食品成分のスクリーニングやその作用量の検定および作用機序を解明する評価方法としては有効であることが示された。しかし、この評価方法によってヒトに外挿した免疫調節作用を検証することには難しい問題がある。それは、ヒトと実験動物ではそれぞれが有する腸内細菌叢が異なること、免疫応答において HLA や MHC といった主要組織適合抗原が異なることが明らかになっており、さらに、実験動物の免疫応答の結果をヒトに外挿するために必要な補正をするためには生物学的なステージに対応した評価や代謝・感受性といった考慮を踏まえて行わなければならないからである。免疫応答に関する限り、

実験動物のデータをヒトへ外挿するにはより厳密な免疫学的なパラメーターが必要であり、その意味でもヒトでの臨床的な検討をあわせて行う必要がある。免疫系に対する保健効果についてヒトを対象にした試験によって評価することは、将来の特定保健用食品としての可能性を論じるうえでは重要な課題であり、それにもまして、このことが国民生活の健康維持増進のために不可欠な課題であると考えられる。今後のさらなる当分野の研究の発展を期待したい。

E. 結論

健康食品の免疫調節作用について動物実験による手法による評価系を用いることは、動物実験レベルでの免疫調節機能を有する食品のスクリーニングやその作用量の検定に有用であると考えられる。さらに、ヒトでの有効性を証明するうえでも動物実験などによる評価方法を用いて健康食品のもつ生体への保健機能（免疫調節作用）の詳細なメカニズムを解明する重要性は大きい。したがって、抗感染食品の評価方法には感染防御反応に重要な IgA 抗体、さらにその IgA 抗体産生の誘導に重要な IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、IFN- γ などのサイトカインなどを測定することが有効性評価方法として意義がある。そこで、今年度はマウスに免疫調節作用が期待される食品成分を実際に経口摂取させ、その免疫応答への影響を検証した。すなわち、プロバイオティクス菌体成分や発酵乳成分、プレバイオティクスとしての難消化性オリゴ糖類などの食品成分をマウスに経口投与したところ、*Bifidobacterium* 菌体は腸管連リンパ組織中（パイエル板、小腸粘膜固有層、盲腸リンパ小節、腸間膜リンパ節など）に取り込まれ、直接、CD11c 陽性細胞を介して免疫反応を感作していることが示唆された。そして、感染防御反応に重要な IgA 抗体の誘導に積極的に関与していることが明らかとなった。さらに、この *Bifidobacterium* 菌体成分については、生菌体はもとより超音波破砕物、加熱処理菌体にも免疫調節作用があることが確認された。以上より、本評価方法は動物実験レベルでの免疫調節機能を有する食品のスクリーニングやその作

用量の検定に有用であると考えられる。なお、国民生活の健康維持増進のために最も重要なことはヒトを対象にした評価方法を確立させることであり、その検証を精度よく進める今後の展開はますます重要性が高いと考えられる。

F. 健康危険情報

特記事項なし。

G. 研究発表

・論文発表

- 1) Nakajima-Adachi H, Ebihara A, Kikuchi A, Ishida T, Sasaki K, Hirano K, Watanabe H, Asai K, Takahashi Y, Kanamori Y, Shimojo N, Matsuda H, Kohno Y, Hachimura S, and Kaminogawa S, Food antigen causes TH2-dependent enteropathy followed by tissue repair in T-cell receptor transgenic mice. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 117, 1125-1132 (2006).
- 2) Takahashi K, Hayashi N, Kaminogawa S, and Ra C, Molecular mechanisms for transcriptional regulation of human high-affinity IgE receptor β -chain gene induced by GM-CSF. *J. Immunol.*, 177, 4605-4611 (2006).
- 3) Nakanishi Y, Murashima K, Ohara H, Suzuki T, Hayashi H, Sakamoto M, Fukasawa T, Kubota H, Hosono A, Kono T, Kaminogawa S, and Benno Y, Increase in terminal fragments of 16S rRNA genes derived from *Bacteroidetes* after administration of short-chain fructooligosaccharides. *Appl. Environ. Microbiol.*, 72, 6271-6276 (2006).
- 4) Tsuda M, Hosono A, Fujioka M, Hachimura S, Nakamura R, Hirayama K, Itoh K, and Kaminogawa S, The role of *Bifidobacterium* in the development of gut immune systems: analysis using gnotobiotic TCR-transgenic mice. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 14, 93-99 (2006).
- 5) Nakanishi Y, Hosono A, Kimura T, and Kaminogawa S, The role of CD4⁺ T cells in IgA production in murine Peyer's patches following oral feeding of *Bifidobacterium* components. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 14, 101-106

(2006).

- 6) Suzuki T, Hosono A, Hachimura S, Suzuki T, and Kaminogawa S, Modulation of cytokine and immunoglobulin A release by beta-(1,3-1,6)-glucan from *Aureobasidium pullulans* strain 1A1. *Animal Cell Technology: Basic & Applied Aspects*, 14, 369-375 (2006).
- 7) Kim JY, Lee S, Jeong DW, Hachimura S, Kaminogawa S, Lee HJ, In vivo immunopotentiating effects of cellular components from *Lactococcus lactis* ssp *lactis*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 786-790 (2006).

・学会発表

- 1) 津田真人・細野朗・柳橋努・八村敏志・平山和宏・梅崎良則・伊藤喜久治・上野川修一. 無菌マウス由来腸管免疫系細胞の抗原特異的なサイトカイン応答に対するマウス常在細菌刺激の影響. 第10回腸内細菌学会 (2006年6月1-2日, 東京) .
- 2) Masato Tsuda, Akira Hosono, Tsutomu Yanagibashi, Satoshi Hachimura, Kazuhiro Hirayama, Yoshinori Umesaki, Kikuji Itoh, Kyoko Takahashi and Shuichi Kaminogawa. Murine intestinal bacteria modulate antigen-specific cytokine production by intestinal immune cells derived from germ-free TCR-transgenic mice. The 19th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2006), Kyoto, Japan (Sep. 25-28, 2006).
- 3) Yasuhiro Hiramatsu, Akira Hosono, Yusuke Nakanishi, Masamichi Muto, Satoshi Hachimura, Ryuichiro Sato, Kyoko Takahashi and Shuichi Kaminogawa. Oral injection of *Bifidobacterium* induces immunomodulation directly following the uptake of bacterial components into the intestinal lymphoid tissues. The 19th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2006), Kyoto, Japan (Sep. 25-28, 2006).

- 4) Tsutomu Yanagibashi, Akira Hosono, Masato Tstuda, Satoshi Hachimura, Kazuhiro Hirayama, Kikuji Itoh, Kyoko Takahashi, Shuichi Kaminogawa. In vitro observation of the effect of intestinal bacteria on IgA production by immunocytes in the large intestine: comparison between germ-free and conventional mice. The 19th Annual and International Meeting of Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2006), Kyoto, Japan (Sep. 25-28, 2006).
- 5) 柳橋努・細野朗・津田真人・八村敏志・高橋宜聖・平山和宏・伊藤喜久治・高橋恭子・上野川修一. 無菌・コンベンショナルマウスの比較による大腸部位における IgA 産生に腸内細菌が与える影響について. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京) .
- 6) 細野朗・柳橋努・中西祐輔・村島弘一郎・深澤朝幸・高橋恭子・上野川修一. フラクトオリゴ糖を構成する異なる糖鎖構造のオリゴ糖によって誘導される腸管粘膜 IgA 産生について. 日本食品免疫学会第2回学術大会(2006年10月23-24日, 東京) .
- 7) 津田真人・細野朗・柳橋努・八村敏志・平山和宏・伊藤喜久治・高橋恭子・上野川修一. 無菌マウス由来腸管免疫細胞の培養系においてマウス腸内共生細菌の刺激が抗原特異的なサイトカイン応答を調節する. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京) .
- 8) 平松靖浩・細野朗・武藤正達・佐藤隆一郎・高橋恭子・八村敏志・上野川修一. 経口投与した *Bifidobacterium* 菌体は腸管免疫組織に取り込まれることで、免疫修飾作用を直接的に誘導する. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京) .
- 9) 三枝静江・戸塚護・上野川修一・細井知弘. 非病原性酵母 *Candida albicans* に対する好中球様 HL60細胞のサイトカイン応答. 日本食品免疫学会第2回学術大会 (2006年10月23-24日, 東京) .
- 10) 田邊康祐・濱口修一・伊勢渉・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志. 経口免疫寛容において誘導

されるT細胞のCD62L/CD44発現パターンと免疫抑制機能。免疫寛容を誘導されたT細胞に特異的に発現する遺伝子の解析。日本食品免疫学会第2回学術大会（2006年10月23-24日，東京）。

- 11) 名倉泰三・富田響子・八村敏志・上野川修一。難消化性オリゴ糖ラフィノースおよびメリビオースの抗アレルギー免疫調節作用日本食品免疫学会第2回学術大会（2006年10月23-24日，東京）。
- 12) Masato Tsuda, Akira Hosono, Satoshi Hachimura, Kyoko Takahashi and Shuichi Kaminogawa, Comparison of the immunomodulatory effects of murine commensal *Lactobacillus* and *Bacteroides* on antigen-specific immune responses by intestinal immune cells derived from germ-free ovalbumin TCR-transgenic mice. 第36回日本免疫学会総会・学術集会（2006年12月11-13日，大阪）。
- 13) Kyoko Takahashi, Natsuko Hayashi, Toshibumi Shimokawa, Shuichi Kaminogawa, Chisei Ra, Synergistic activation of Fc receptor γ -chain gene expression by Sp-1 and GABP in mast cells. 第36回日本免疫学会総会・学術集会（2006年12月11-13日，大阪）。
- 14) Yukiko Umeda, Yoko Akema, Masayuki Kuraoka, Kiyoshi Yamada, Masayuki Hashiguchi, Wataru Ise, Taku Kouro, Yoshimasa Takahashi, Mamoru Totsuka, Kiyoshi Takatsu, Shuichi Kaminogawa, Ryuichiro Sato, satoshi Hachimura, CD3 IL-2R⁺ Peyer's patch cells respond to poly I:C stimuli and secrete IL-5. 第36回日本免疫学会総会・学術集会（2006年12月11-13日，大阪）。
- 15) 津田真人・細野朗・柳橋努・八村敏志・平山和宏・伊藤喜久治・高橋恭子・上野川修一。無菌マウスにおける食品抗原特異的な免疫応答の特徴：腸管免疫系と全身免疫系のサイトカイン産生

の違い。日本農芸化学会2007年度大会（2007年3月24-27日，東京）。

- 16) 高橋恭子・細野朗・上野川修一。腸管上皮細胞におけるTLR4遺伝子の発現制御機構。日本農芸化学会2007年度大会（2007年3月24-27日，東京）。
- 17) 相澤奉文・高橋恭子・細野朗・石嶋慶太・城内健太・中村重矢・西村和大・上野川修一。ビフィズス菌菌体破砕物のアレルギー反応抑制効果。日本農芸化学会2007年度大会（2007年3月24-27日，東京）。
- 18) 笠倉和巳・高橋恭子・青山円佳・石田里沙・大澤香織・細野朗・上野川修一。TLR-2を介したマスト細胞のアレルギー応答の調節。日本農芸化学会2007年度大会（2007年3月24-27日，東京）。
- 19) 原田岳・何方・川瀬学・細野朗・高橋恭子・上野川修一。 *Lactobacillus rhamnosus* GG と *Lactobacillus gasseri* TMC0356による腸管免疫応答に与える影響。日本農芸化学会2007年度大会（2007年3月24-27日，東京）。
- 20) 田邊康祐・濱口修一・伊勢渉・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志。経口免疫寛容において誘導される CD62L^{high/Int} CD44^{Int} および CD62L^{low} CD44^{high} 制御性T細胞の機能解析。日本農芸化学会2007年度大会（2007年3月24-27日，東京）。
- 21) 谷貝英紀・後藤浩文・後藤貴康・野中敦子・伊勢渉・山田潔・戸塚護・高橋宜聖・北村俊雄・上野川修一・佐藤隆一郎・八村敏志。経口免疫寛容を誘導されたT細胞に高発現する遺伝子zfhx1bの機能解析。日本農芸化学会2007年度大会（2007年3月24-27日，東京）。

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
特になし。

厚生労働省科学研究費補助金(食品の安心・安全確保推進研究事業)
いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究(H16-食品-003)分担研究報告書

妊婦の腸内細菌叢および臍帯血単核球からのサイトカイン産生を指標としたアレルギー改善食品の評価法に関する研究

分担研究者 河野 陽一 千葉大学大学院医学研究院小児病態学教授
研究協力者 下条直樹 (千葉大学大学院医学研究院小児病態学助教授)
鈴木修一 (千葉大学大学院医学研究院小児病態学)
河田 誠 (JFE 健康保険組合川鉄千葉病院副院長)
勝木利行 (JFE 健康保険組合川鉄千葉病院小児科医長)
池上秀二 (明治乳業研究本部食機能科学研究所課長)
山口 真 (明治乳業研究本部食機能科学研究所)

研究要旨

1) 臍帯血単核球からの腸内細菌 (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *E. coli*) とその主要成分 (lipopolysaccharide, peptidoglycan) の刺激による TNF- α 、IL-10 産生能と生後 7 か月までの湿疹発症の有無の関連を解析し、以下の結果を得た。i) *E. coli* 刺激による臍帯血単核球からの TNF- α 産生は、湿疹発症群において湿疹非発症群よりも有意に低下していた。ii) *B. bifidum*, *Lactobacillus rhamnosus* GG, *E. coli*, peptidoglycan 刺激による臍帯血単核球からの IL-10 産生は、湿疹発症群において湿疹非発症群よりも有意に低下していた。

2) 周産期母子腸内細菌叢と臍帯血 IgE との関連を検討し、以下の結果を得た。i) 母親の腸内 *Bifidobacterium* 菌数、あるいは *Bifidobacterium* / *Bacteroides* 比と臍帯血 IgE には負の相関が認められた。ii) 新生児期の腸内 *Bifidobacterium* 菌数と母親の腸内 *Bifidobacterium* 菌数に正の相関が認められた。

昨年度までの研究結果とあわせて、以下の 2 点が示唆される。①アレルギー発症予防に有用なプロバイオティクスの選定の指標として、臍帯血免疫細胞からの IL-10 産生刺激能が有用である、②妊婦への投与により児のアレルギー発症を予防しうる可能性のあるプロバイオティクス、プロバイオティクス等の食品の選択の指標として、妊婦の *Bifidobacterium* 菌数が有用である。

A. 研究目的

腸内細菌叢の偏倚はアレルギー疾患の発症や症状の増悪に関与していると考えられる。近年プロバイオティクスやプレバイオティクスがアレルギー疾患の発症予防や症状軽減に有用であるとの研究報告がなされている。しかしながら本邦での研究報告は少な

く、さらにどのようなプロバイオティクスが、どのような個体において、アレルギーの予防に有効であるのかも不明である。

本研究は乳幼児期の代表的アレルギー疾患である湿疹の発症予防の観点から、妊婦、新生児に投与されるプロバイオティクス等の食品の有用性のヒトでの評価法について検

討した。

B. 方法

1) 新生児のコホート集団について、腸内細菌およびその主要成分の刺激により臍帯血単核球から産生される炎症性サイトカイン、調節性サイトカインと生後7か月での湿疹との関連を解析した。

2) 母体および新生児の便中 *Bifidobacterium* 菌数と臍帯血 IgE 値の関連を解析した。(図1)。

C. 研究結果

1) 腸内細菌とその主要分子の刺激による臍帯血単核球からの TNF α 、IL-10 産生と生後7か月までの湿疹の関連

Bifidobacterium, *lactobacillus*, *E. coli* と腸内細菌の主要成分である lipopolysaccharide, peptidoglycan による刺激での臍帯血単核球からの TNF- α 、IL-10 産生と生後7か月での湿疹の有無の関連を解析した。全体的に腸内細菌とその主要成分の刺激による TNF- α 、IL-10 産生能は湿疹発症群で非発症群に比べて低値をとっていた。統計学的な解析では、湿疹発症群における *E. Coli* 刺激による TNF- α 産生量は湿疹非発症群に比べて有意に低値であった(図2)。また、*B. bifidum*, *Lactobacillus rhamnusus* GG, *E. coli*, peptidoglycan 刺激による臍帯血単核球からの IL-10 産生は、湿疹発症群において湿疹非発症群よりも有意に低下していた。(図3)。

2) 周産期母子腸内細菌叢と臍帯血 IgE との関連

出産後早期の母体の糞便中の *Bifidobacterium* 菌量、*Bacteroides* 菌量と従来からアレルギー疾患発症の予測マーカーとして有用性が指摘されている臍帯血 IgE 値の関連を検討した。*Bifidobacterium* 菌量は

臍帯血 IgE 値が低値であるほど有意に多かった(図4)。一方、*Bacteroides* 菌量は臍帯血 IgE が高値なほど多い傾向が見られたが統計学的な有意差は認められなかった。*Bifidobacterium* 菌量と *Bacteroides* 菌量の比は臍帯血 IgE 値と有意の負の相関が認められた(図5)。生後4日目および1か月目の児の糞便中の *Bifidobacterium* 菌量、*Bacteroides* 菌量と臍帯血 IgE 値には関連が認められなかった(データは示さず)。

母親の糞便中の *Bifidobacterium* 菌量は生後4日目および生後1か月目の児の糞便中の妊娠中の胎児の *Bifidobacterium* 菌量と有意に相関していた(図6)。新生児期の *Bifidobacterium* の定着の有無は母体糞便中の *Bifidobacterium* 菌量と有意な関連が認められた(図7)。

D. 考察

プロバイオティクスは健康食品として従来から食われてきているが、アレルギー疾患における腸内細菌叢の異常やプロバイオティクスの抗アレルギー作用に関する最近の研究報告により、アレルギー予防・改善食品としての認識が高まっている。しかし、従来の報告の多くは北欧を中心とする海外のデータであり、本邦での臨床治験はいまだに多くはない。また、我々が行なった乳幼児アトピー性皮膚炎患者における腸内細菌叢の解析では、腸内細菌叢の異常は海外の報告と同様に存在するがアレルギー発症に関連する菌は海外の報告とは異なるものであった。したがってプロバイオティクス等のアレルギー予防・改善食品としての評価法を、日本人を対象として確立することが重要と考えられる。

今年度の研究により、腸内細菌およびその成分による臍帯血中自然免疫担当細胞からのサイトカイン産生の多寡が乳児期の湿疹

に関連することが示唆された。本研究では症状の有無をアンケート調査で行なっているので症状を「湿疹」としているが、これらの「湿疹」はその継続期間とかゆみなどの症状から乳児期の代表的アレルギー疾患であるアトピー性皮膚炎と考えられる。検討したサイトカインの中で特にIL-10は最近の研究結果からアレルギー反応の発症を抑制するサイトカインと考えられている。したがって、臍帯血単核球からの腸内細菌とその成分によるIL-10産生低下がその後のアレルギー疾患発症に関連することは理解しやすい。自然免疫系からのIL-10産生を促進する腸内細菌、プロバイオティクスがアレルギー疾患の予防に有用か否かはまだ本邦では明らかにされていない。しかし、北欧の介入研究で *Lactobacillus rhamnosus GG* 投与でアトピー性皮膚炎が改善した乳児において血清IL-10の増加が認められていることは、自然免疫系からのIL-10産生を促進するプロバイオティクスが乳児期のアレルギー疾患の発症予防、症状軽減に有用である可能性を示唆している。しかしながら、実際にどのようなプロバイオティクスが日本人のアレルギー疾患発症予防に有用か否かは明らかではない。代表的なプロバイオティクスである *Bifidobacterium* に属する *B. bifidum* と *B. adolescentis* は臍帯血単核球からのサイトカイン誘導能に明らかな差異があることを我々は昨年度の本研究で報告している（図8）。すなわちプロバイオティクスの中でも菌属、菌種、さらに菌株によりIL-10産生誘導能は異なると考えられる。臍帯血単核球を用いたIL-10産生測定系は、アレルギー予防・改善食品としてのプロバイオティクスのスクリーニング法として有用であることが示唆される。

臍帯血 IgE 値は必ずしも特異度の高いアレルギー疾患発症予測因子ではないが、従来

から広く発症予知因子のひとつとして用いられている。本年度の研究結果からは、臍帯血 IgE 値と母体の糞便中の *Bifidobacterium* 菌量が関連することが明らかとなった。乳児期の *Bifidobacterium* 菌量の少なさと児のアレルギー疾患発症が関連することは海外のみでなく本邦の調査研究からも明らかにされている。今回の我々の研究から新生児の腸内 *Bifidobacterium* 定着および菌数が母体の *Bifidobacterium* 菌量により規定されている可能性が示された。これらの結果は、妊婦の腸内細菌叢を整えることが児のアレルギー疾患発症を予防する上できわめて重要なアプローチであることを示している。母体の腸内 *Bifidobacterium* 菌量を増やすにはプロバイオティクスやプレバイオティクスの摂取が有用と考えられる。そこで妊婦の腸内 *Bifidobacterium* 菌量を指標として児のアレルギー発症予防効果を期待しうる食品を選択できる可能性がある。

腸内細菌叢の改善につながるプロバイオティクスやプレバイオティクスの投与は児の胎児期からの自然免疫機能を正常化し、さらに生後の腸内細菌叢の正常な発達を促進することによりアレルギー疾患の発症予防に有用であると考えられる（図9）。

E. 結論

1) 妊娠期女性の腸内 *Bifidobacterium* 増殖効果を指標とする評価法は、アレルギー改善・予防食品としてのプロバイオティクス、プレバイオティクスのスクリーニングとして有用であると考えられる。

2) 臍帯血抗原提示細胞からの IL-10 (TNF- α) 産生の誘導能を指標とする評価法は、プロバイオティクス、プレバイオティクスのスクリーニングとして有用であると考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Suzuki, S., Shimojo, N., Tajiri, Y., Kumemura, M. and Kohno Y. (in press) Differences in the composition of intestinal Bifidobacterium species and the development of allergic diseases in infants in rural Japan. Clin. Exp. Allergy.
2. 下条直樹, 鈴木修一, 河野陽一 プロバイオティクスと疾患 アトピー性皮膚炎とプロバイオティクス 医学のあゆみ別冊プロバイオティクス Page63-66, 2005

2. 学会発表

1. 鈴木修一, 下条直樹, 田尻義人, 久米村恵, 河野陽一 乳児期の腸内細菌叢とアレルギー発症との関連 腸内細菌学雑誌 19:97, 2005

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

図2 腸内細菌および菌体細胞壁成分に対する臍帯血単核球のTNF-α産生能と湿疹発症

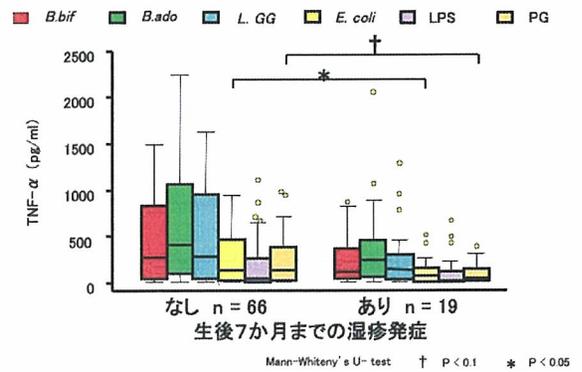


図4 臍帯血IgEと母親の出産時 Bifidobacterium, Bacteroides菌数

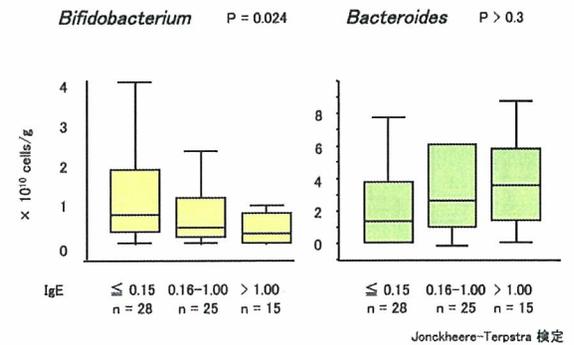


図5 臍帯血IgEと母親の出産時 Bifidobacterium / Bacteroides比

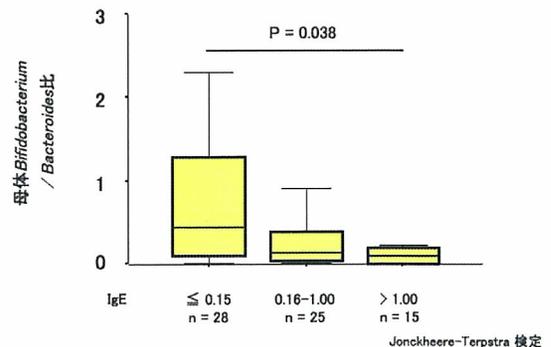


図1 研究のアウトライン

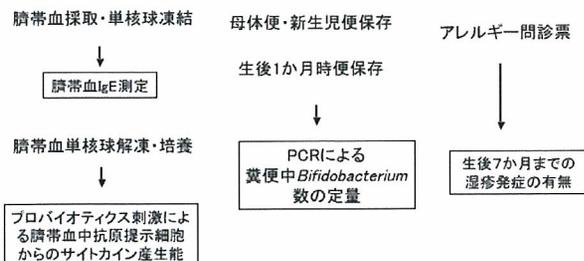


図6 母親と児の便中 *Bifidobacterium* 菌数の関連

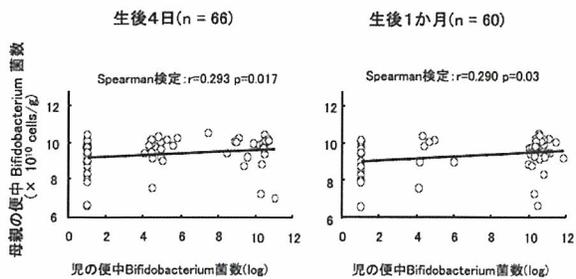


図7 新生児 *Bifidobacterium* の定着と母親の出産時 *Bifidobacterium* 菌数

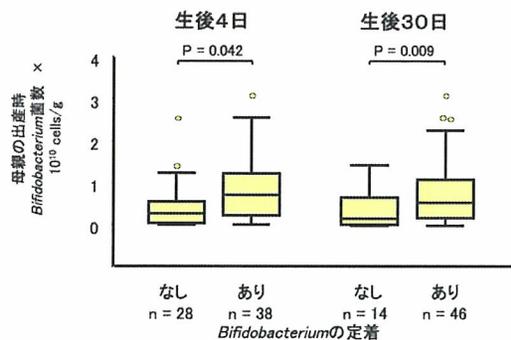


図8 臍帯血抗原提示細胞からのサイトカイン産生誘導能における *Bifidobacterium* 菌種における差異

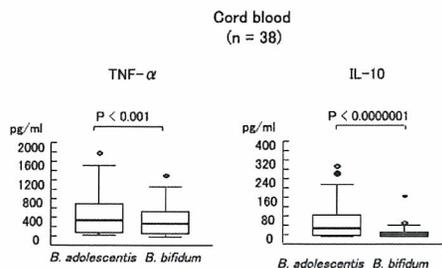


図9 腸内細菌叢を標的とするアレルギー発症予防戦略

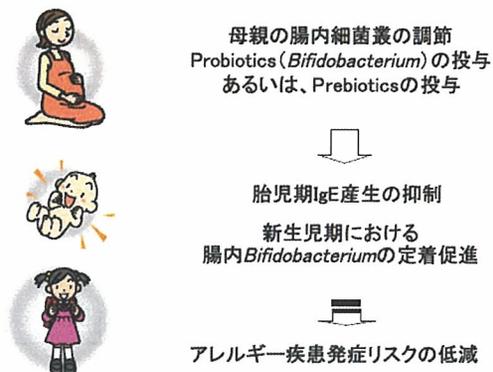
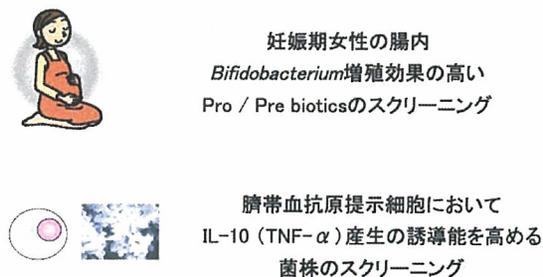


図10 周産期における小児アレルギー疾患発症リスク改善食品の評価法



いわゆる健康食品の有効性の評価に関する研究 - 食品のもつ免疫調節機能、アレルギー予防機能の評価方法の確立 -

分担研究者 戸塚 護 東京大学・大学院農学生命科学研究科 助教授
研究協力者 山田 潔 東京大学・大学院農学生命科学研究科 寄付講座教員

研究要旨 免疫調節機能を有する食品成分の中には、腸管上皮細胞への作用を介してその機能を表すものもあると考えられるが、それを評価する実験系は確立されていない。このような評価系の確立を目的として、マウス小腸および大腸由来の初代培養上皮細胞にガン遺伝子を導入して不死化することにより、新規上皮細胞株を樹立した。小腸由来上皮細胞株および大腸上皮細胞株の間で、MHCクラスII分子発現、菌体成分刺激に対するサイトカイン産生、網羅的遺伝子発現パターンに差異が認められた。樹立した細胞株を用いて、菌体成分で刺激を受けた上皮細胞株が粘膜固有層B細胞のIgA産生を増強する可能性を検討したところ、ビフィズス菌にその活性が見いだされ、上皮細胞株を用いた免疫調節機能評価系の構築が可能であることが示された。今後、様々な腸管免疫担当細胞との相互作用を解析する評価系を構築することにより、各種食品成分の腸管上皮細胞を介した免疫調節機能を検索・解析することが可能となると考えられる。

A. 研究目的

近年、食品成分が免疫系に与える影響の重要性に対する認識が高まっている。プロバイオティクスなどの食品が、免疫調節機能、アレルギー予防機能を有することも明らかにされてきている。その作用は、腸管免疫系において最も顕著に現れると考えられる。しかしながら、多様な機能を示す腸管免疫系を構成する各細胞の機能や、機能発揮に重要な分子や作用メカニズムは十分に明らかにされていない。そのため、食品成分の腸管免疫系に与える影響の評価系も、現状では十分に構築できているとは言えない状況である。

本研究では、腸管免疫系を構成する細胞のうち腸管腔壁を覆う腸管上皮細胞（Intestinal epithelial cell; IEC）に着目した。腸管上皮は腸管粘膜における感染防御の最前線を形成しており、同時にその存在位置からプロバイオティクス等の食品成分の影響を強く受けることが予想される。消化吸収機能を担うIECは、IgA抗体を管腔側へ分泌する機能を有するほか、T細胞への抗原提示に必須であるMHCクラスII分子を発現し、様々なサイトカインやケモカインを産生する。

IECが樹状細胞やT細胞との相互作用により

免疫応答の調節に大きく関与することが、近年、明らかにされつつある。さらにToll様レセプター（TLR）など、感染微生物に保存された分子パターンを認識するパターン認識レセプターを発現することから、それを介して腸内細菌やプロバイオティクスなどの微生物成分を認識し、腸管免疫系の調節を行なっている可能性が考えられている。また、このような免疫関連機能は、小腸および大腸のIECでは異なることが予想されるが、その差異の詳細は明らかにされていない。

そこで本研究では、食品成分の腸管免疫系に対する調節機能の評価系のうち、IECへの作用を介した免疫調節機能を評価する実験系の構築を目的として研究を行った。免疫調節機能の解析に有用なマウスを用い、小腸および大腸に由来する新規IEC細胞株の樹立を試みた。これらの新規細胞株を用いて、プロバイオティクスなどの食品成分の腸管免疫調節機能を、IECへの作用の観点から評価する実験系を構築した。

B. 研究方法

<新規マウスIEC細胞株の作製>

ガン遺伝子のひとつであるSV40ラージT抗原（TA_G）のcDNAをレトロウイルス発現ベク

ターpMX-IG のクローニング部位へ挿入し、発現ベクターpMX-TAg-IGを得た。パッケージング細胞 PLAT-E に pMX-TAg-IG をリポフェクション法により導入し、TAg 発現レトロウイルスを産生させた。PLAT-E および pMXs-IG (Kitamura, T. *et al.*, *Exp. Hematol.* 31:1007-1014 (2003)) は、東京大学医科学研究所の北村俊雄教授より供与していただいた。

胎生期 16 日目の BALB/c マウス胎仔から摘出した小腸または大腸を切開し、シート状にした後、約 1 mm の断片に切断した。腸組織片を EDTA 溶液中で浸とを繰り返した後、腸組織片を 6 cm ディッシュ中、DMEM 培地で培養した。

培養 5 日目に組織片を除き、TAg 発現レトロウイルスを感染させた。感染 48 時間後、培地交換を行い、さらに、10-14 日間培養した。細胞をトリプシン処理により回収後、サブクローニングを行い、単クローンからなる小腸および大腸由来 IEC 細胞株を得た。

<免疫組織染色>

得られた IEC 細胞株について、細胞骨格タンパク質に対する免疫組織化学染色を行った。コラーゲンコーティングした 8-well Chamber Slide に 2×10^4 個/well で IEC 培養株をまき、4 日間培養後、氷冷アセトンで固定した。1% 正常ヤギ血清 (NGS)、0.1% Triton-X-100 を含む PBS でブロッキングした後、1% NGS、0.1% Triton-X-100 を含む PBS で希釈した一次抗体を用い、1 時間室温中で抗原抗体反応を行った。洗浄後、PBS で希釈した二次抗体を用いて 1 時間室温中で反応させた後、封入操作を行い、蛍光顕微鏡で観察した。

また、MHC クラス II 分子の細胞表面への発現については、蛍光標識した抗 MHC クラス II 分子抗体を用い、フローサイトメトリー解析を行った。

<DNA マイクロアレイ解析>

DNA マイクロアレイ解析には、Affymetrix 社の GeneChip システムを用いた。各 IEC 細胞株から抽出した全 RNA 3 μg をもとに、One-Cycle Target Labeling and Control Reagent package を用いてビオチン標識相補的 RNA を合成した。これを、GeneChip (Mouse Genome 430 2.0 Array) にハイブリダイズさせ、蛍光強度を遺伝子発現強度として検出することで遺伝子発現解析を行った。このデータをもとに、データ解析ソフト

ウェア GeneSpring (TOMY DIGITAL BIOLOGY) を用いて、標準化処理によりデータを補正した後、クラスター解析をおこなった。

<菌体成分刺激に対する応答の解析>

前日 12-well プレートに 2×10^5 /well となるように播種した IEC 細胞株に対し、細胞の接着を確認後、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリポ多糖 (LPS)、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドグリカン (PGN)、30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の各種加熱処理菌体で 5 時間の刺激培養を行った。加熱処理菌体の調製は、75°C で 1 時間熱処理を行った後、凍結乾燥した。

分泌されたサイトカイン、ケモカインの定量を行うためには、5 時間の刺激培養後、新しい培地と交換し、その 24 時間後の培養上清を回収した。サイトカイン、ケモカインの定量は、特異抗体をもちいたサンドイッチ酵素免疫測定法により行った。

mRNA 発現の解析のためには、5 時間の刺激培養後、RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いて全 RNA を抽出した。全 RNA を Oligo-dT プライマーと混合し、逆転写酵素 (SuperScript II、Invitrogen) により cDNA を得た。各遺伝子に特異的なプライマーセットを用い、QuantiTectTM SYBR Green I PCR Kit (QIAGEN) を用いて LightCyclerTM (Roche Diagnostics GmbH) による定量的 RT-PCR 法を行った。各遺伝子について標準試料を調製し、それをもとに作成された標準曲線から、各試料中の当該遺伝子 mRNA のコピー数を算出した。ハウスキーピング遺伝子の一つである HPRT 遺伝子についても同様の方法で mRNA コピー数を定量し、単位 HPRT mRNA コピー数あたりの各遺伝子の mRNA コピー数として、結果を表示した。

<腸管粘膜固有層リンパ球の IgA 抗体産生>

BALB/c マウス (8 週齢、メス) の小腸を摘出し、内容物を洗浄後、パイエル板を取り除いた。反転した小腸を断片化し、EDTA 処理で IEC および上皮内リンパ球を除いた後、コラーゲナーゼ処理を行った。ガラスウールカラムで濾過処理して接着性の細胞を除去した後、パーコール密度勾配遠心分離によりリンパ球画分を得た。これを腸管粘膜固有層リンパ球とした。

腸管粘膜固有層リンパ球を、LPS、CpG (TLR9 のリガンド)、Pam3CSK4 (TLR2 のリガンド) 刺激を受けた IEC 細胞株の培養上清、あるいは菌体成分の存在下、7 日間培養し、その上清中の総 IgA 量を酵素免疫測定法により定量した。

C. 研究結果

<新規マウス小腸 IEC および大腸 IEC 細胞株の樹立とその基本特性>

SV40 ラージ T 抗原を初代培養 IEC にレトロウイルスベクターを用いて遺伝子導入することで、BALB/c マウス胎仔から新規小腸由来 IEC 細胞株を 13 株、大腸由来 IEC 細胞株を 6 株樹立した。そのうち、2 株ずつを中心に解析を行った。樹立した細胞株はいずれも上皮細胞に特徴的な敷石状の形態を示した (図 1)。また、いずれの細胞株も上皮細胞マーカーのサイトケラチン陽性 (図 2)、間葉細胞マーカーのビメンチン陰性、タイトジャンクション構成タンパク質の ZO-1 陽性、微絨毛タンパク質のエズリン陽性であった (データ省略)。これらの結果より、樹立した細胞株が上皮細胞としての性質を有することが示された。

また、いずれの細胞株も成熟マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を有していた。このことから、得られた IEC 細胞株は機能的に分化したものであることが示唆された。その活性は、大腸由来細胞株よりも小腸由来細胞でより強いことが明らかとなった (図 3)。

IEC 細胞株で MHC クラス II 分子の発現をフローサイトメトリー解析したところ、定常状態での発現は認められなかったが、インターフェロン γ (IFN- γ) 処理による MHC クラス II 分子の発現誘導は、小腸 IEC 細胞株において顕著に認められた (図 4)。IFN- γ 刺激した小腸 IEC 細胞株は、T 細胞に対してペプチド抗原を提示する機能を有することが示されている (データ省略)。一方、大腸 IEC 細胞株では IFN- γ 刺激後でも、MHC クラス II 分子の発現誘導は非常に弱かった。

Affimetrix 社の GeneChip システムを用いて各 IEC 細胞株の定常状態における遺伝子発現パターンを調べ、その結果をクラスター解析した。その結果、小腸 IEC 細胞株と大腸 IEC 細胞株の 2 群にグループ化された (図 5)。小腸 IEC 細胞株に比べ、大腸 IEC 細胞株で発現が 5 倍以上高かった遺伝子は 65 個、5 倍以上低かった遺伝子は 294 個あり、ジペプチジルペプチダーゼ 4 の発現が小腸特異的に確認されるなど、消化酵素遺伝子でも差が見られた (データ省略)。これらの結果から、樹立した細胞株はいずれも IEC としての基本特性を有しており、小腸 IEC 細胞株と大腸 IEC 細胞株ではそれぞれ異なる性質を有することが示唆された。

<新規 IEC 細胞株の自然免疫機能の解析>

次に、樹立した IEC 細胞株の菌体成分に対する応答を検討した。LPS、PGN 刺激後 24 時間培養した上清中の IL-6、MCP-1 産生を ELISA 法で確認した結果、いずれの細胞株も IL-6、MCP-1 を産生し、刺激によって産生量が増加した (図 6)。

小腸 IEC 細胞株と大腸 IEC 細胞株との間で、菌体成分刺激後の遺伝子発現に差が認められたものを図 7 に示した。いずれもケモカインである KC (CXCL1)、MIP-2 (CXCL2)、ENA78 (CXCL5) は大腸 IEC 細胞株で発現が高く、逆に IP-10 (CXCL10) は小腸 IEC 細胞株で発現が高かった。

<菌体刺激を受けた小腸 IEC 細胞株からの液性因子による粘膜固有層 B 細胞の IgA 産生増強>

食品成分の刺激を受けた IEC が、液性因子を介して粘膜固有層 B 細胞の IgA 抗体産生に影響を及ぼす可能性を検討した (図 8A)。すなわち、小腸 IEC 細胞株を、各種菌体あるいは菌体成分で 5 時間刺激し、培地交換をしてから 48 時間後の培養上清を回収し、小腸粘膜固有層リンパ球の培養系に添加したときの IgA 抗体産生量を測定した。その結果、LPS、Pam3CSK4、ビフィズス菌 (*Bifidobacterium bifidum*) 加熱処理菌体で刺激した培養上清を添加した場合に、有意な IgA 抗体産生の増加が認められた。一方、IEC 細胞株の刺激に用いた試料を、直接粘膜固有層リンパ球画分に作用させた場合に、IgA 抗体産生増強効果を示すかどうかを検討したところ、Pam3CSK4 を粘膜固有層リンパ球の培養系に添加した場合にのみ、IgA 抗体産生の増強が認められた (図 8B)。LPS およびビフィズス菌加熱処理菌体には、その効果は認められなかったことから、これらの刺激を受けた小腸 IEC 細胞株の培養上清中には、IgA 抗体産生増強効果を示す液性因子が含まれていることが明らかとなった。

IL-6 は、B 細胞の IgA 産生を増強する機能をもつことが知られている。そこで、各刺激を受けた小腸 IEC 細胞株の培養上清中の IL-6 量を測定した (図 9)。その結果、Pam3CSK4 とビフィズス菌加熱処理菌体で刺激した場合に、強い IL-6 産生誘導が認められ、LPS で刺激した場合にも IL-6 産生が誘導されることが明らかとなった。

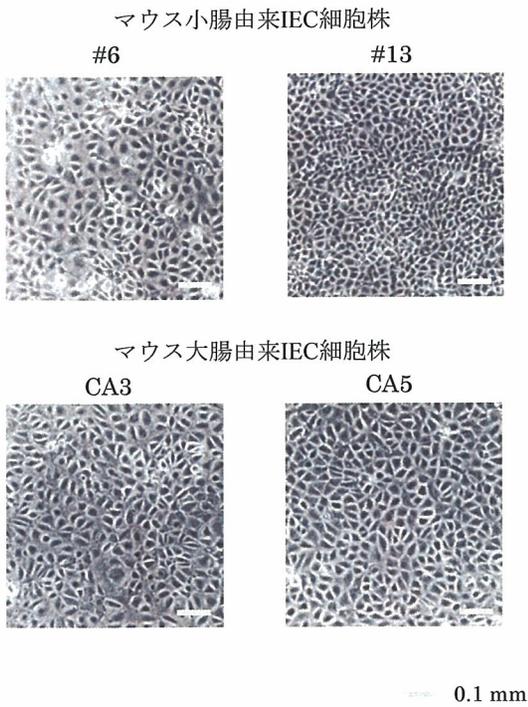


図1 樹立したマウスIEC細胞株の位相差顕微鏡像

マウス小腸由来IEC細胞株 (#6、#13) およびマウス大腸由来IEC細胞株 (CA3、CA5) について示した。

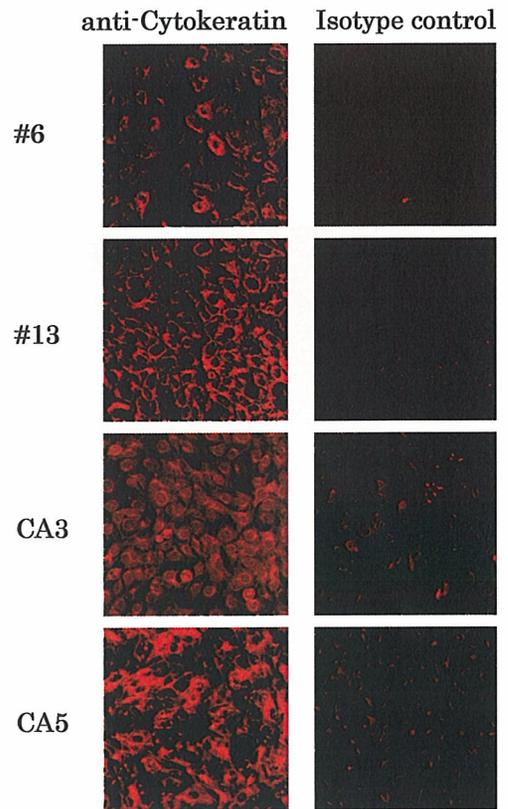


図2 マウスIEC細胞株におけるサイトケラチンの発現

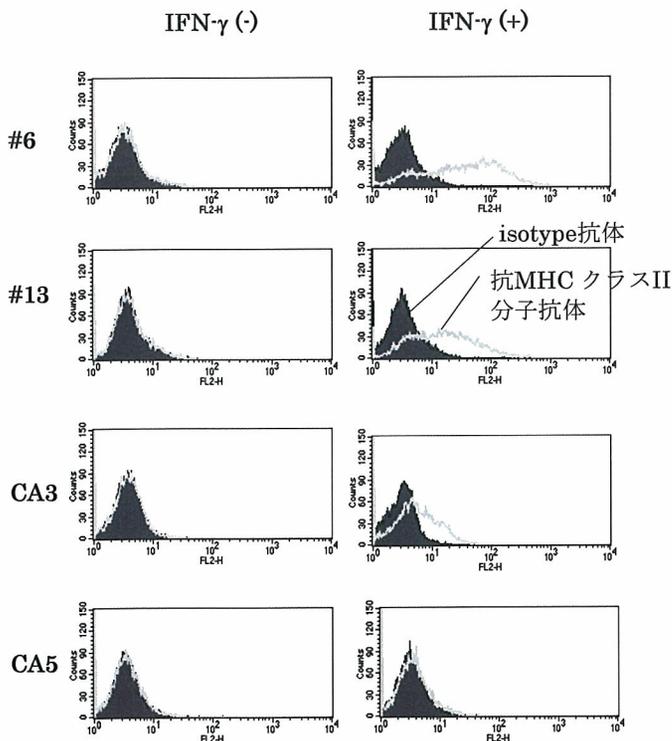


図3 マウスIEC細胞株によるMHCクラスII分子の発現

IFN- γ (20 ng/ml) 存在、非存在下で2日間培養した細胞株のMHCクラスII発現を、フローサイトメトリーを用いて解析した。

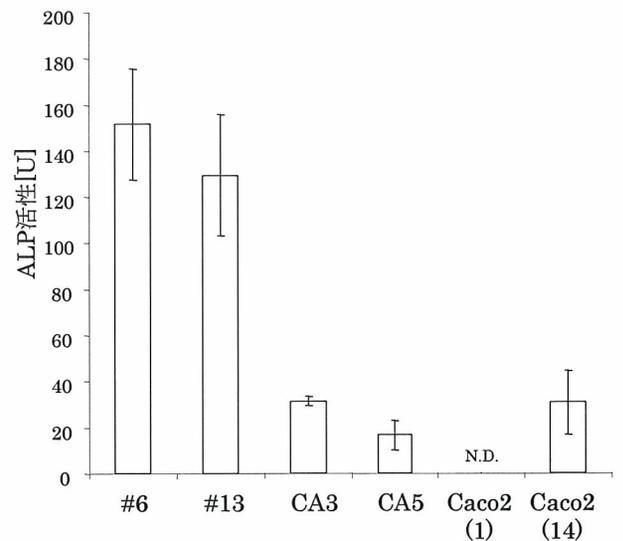


図4 マウスIEC細胞株ライセートのアルカリフォスファターゼ活性

マウスIEC細胞株 (#6、#13、CA3、CA5)、播きなおしてから1日間および14日間培養したCaco-2細胞について、アルカリフォスファターゼ活性を測定した。活性 (U) は4-ニトロフェノール (μM) / mg (タンパク質) / minで算出した。

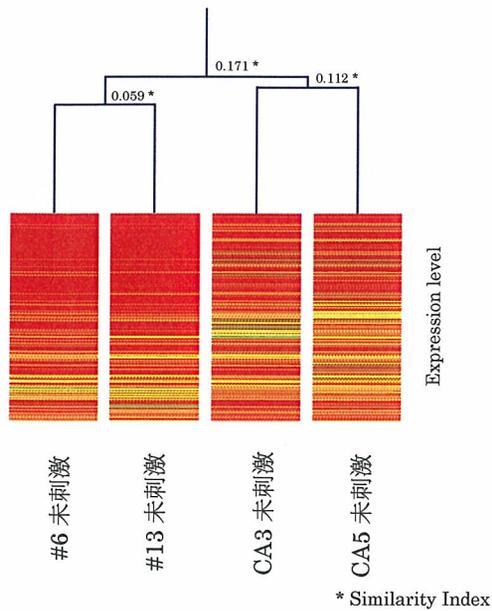


図5 DNAマイクロアレイによるマウスIEC細胞株のクラスター解析

定常状態における新規IEC株の遺伝子発現パターンから、それぞれの株の類似性をクラスター解析により求めた。Similarity Indexは遺伝子発現パターンの類似性を示しており、値が小さいほど類似性が高いことを示している。

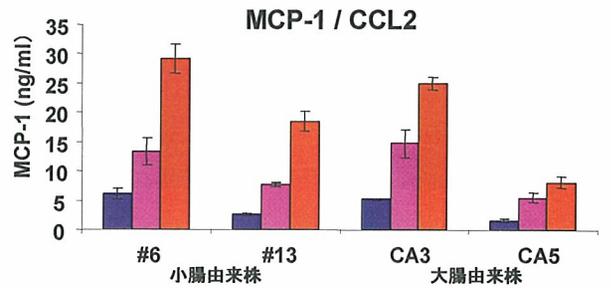
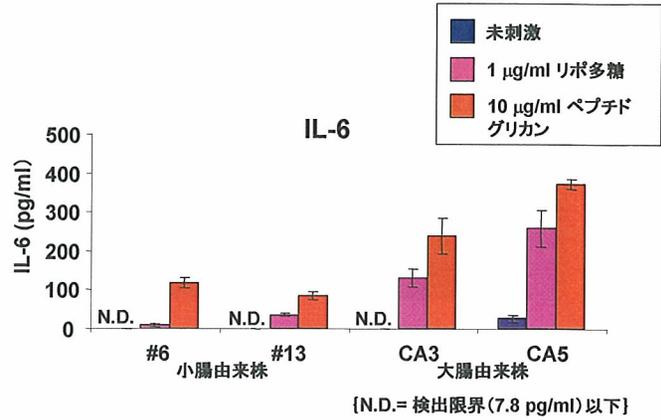


図6 菌体成分刺激に対するマウスIEC細胞株のIL-6およびMCP-1 (CCL2) の分泌応答

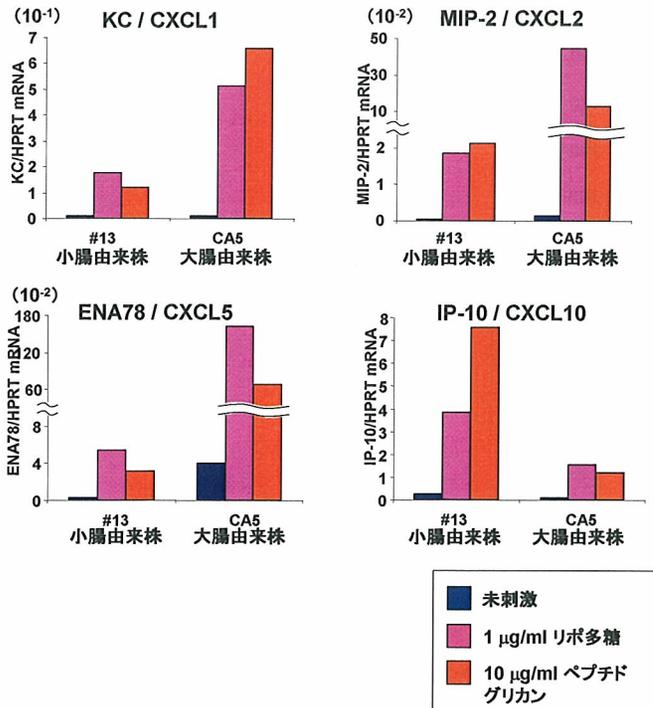


図7 菌体成分刺激に対するマウスIEC細胞株のケモカイン遺伝子発現応答

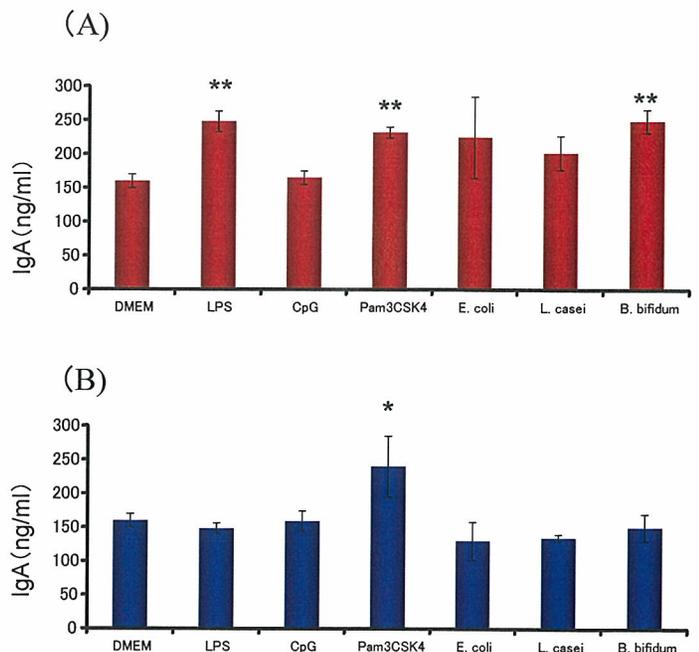


図8 菌体成分で刺激した小腸IEC株 (#1) の上清による粘膜固有層B細胞のIgA産生増強効果

- (A)各試料で刺激した小腸IEC細胞株の上清を粘膜固有層リンパ球の培養系に添加した。
- (B)各資料を粘膜固有層リンパ球の培養系に添加した。

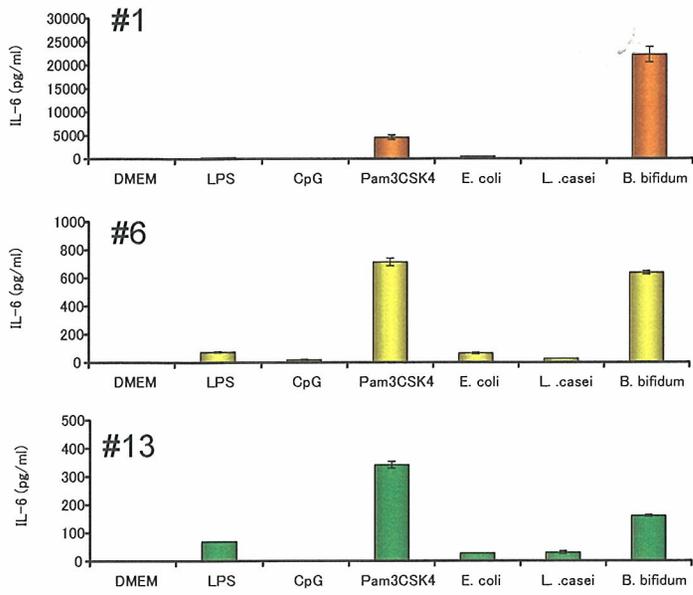


図9 菌体成分で刺激した小腸IEC株のIL-6分泌

D. 考 察

本研究では、小腸および大腸由来の新規マウス IEC 細胞株を樹立し、その特性を明らかにした。小腸 IEC 細胞株と大腸 IEC 細胞株では、アルカリフォスファターゼ活性、MHC クラス II 分子の発現、刺激時のケモカイン産生などに違いが認められ、網羅的な遺伝子発現パターン解析からも異なる遺伝子発現をしていることが明らかとなった。さらに詳細な検討が必要ではあるが、これらの新規 IEC 細胞株は、生体内の小腸および大腸 IEC の性質を反映しているものと考えられる。

IEC は腸管関連リンパ組織を構成する組織の中でも、常に食品抗原や微生物に曝される環境にあるため、それらに対して認識・応答し、免疫担当細胞とのクロストークを介して腸管免疫系の調節に積極的に関わっている可能性が考えられている。実際、本研究でも刺激を受けた IEC が産生する液性因子が、B 細胞の IgA 抗体産生を増強することを見いだした。

腸管腔に分泌され、腸管における感染防御に重要な働きをしている IgA 抗体は、主に腸管上皮層下の粘膜固有層に存在する B 細胞が産生している。IgA 抗体産生を増強する作用を有する食品成分は、腸管における感染予防に有効であるものと考えられる。これまでに実験動物個体への経口投与により IgA 抗体産生増強効果が示されてきた食品成分の中には、IEC への作用を介してその機能を発揮しているものもあると考えられる。従来のパイエル板細胞の *in vitro* 培養系における IgA 抗体産生への効果を評価する実験系に加えて、IEC 細胞株への作用を介した IgA 抗体産生増強についても検討することで、免疫調節作用を示す食品成分の作用機作の解明に役立つものと考えられる。また、従来の方法では見逃されていた免疫調節機能因子が、この評価系により新たに発見されることも期待される。

IEC は、上記のような B 細胞だけでなく、小腸上皮内リンパ球や、粘膜固有層に存在する T 細胞や樹状細胞・マクロファージなどとの相互作用を介して、腸管免疫系の調節を行っていることも考えられる。今後、IEC とこれらの各種免疫担当細胞との相互作用を解析する実験系を構築することにより、従来腸管免疫調節機能の評価系とあわせて、総合的に食品成分の腸管免疫調節機能の評価できるようになると考えられる。

食品機能の研究は、人の健康への効果を明らかにするものである必要がある。本研究では、腸管免疫調節機能の評価系構築のモデル系として、マウス由来の細胞を用いたが、最終的にはヒト細胞を用いた評価系の構築につなげなければならない。マウスにおける評価系を用いて、免疫調節のメカニズム、それに関わる分子を特定することができれば、主に結腸ガンに由来する既存のヒト IEC 様細胞株の中から適したものを選択し、当該分子の挙動を指標とした評価系の構築が可能となるものと考えられる。

E. 結 論

食品成分の免疫調節機能の評価系構築を目的として、腸管免疫系における食品成分の重要な作用点と考えられる IEC に着目した。免疫機能の評価に適したマウスを用い、小腸および大腸由来の IEC 培養株を樹立した。食品成分が IEC への作用を介して免疫調節を行う一つの例として、食品成分が IEC の液性因子を介して B 細胞の IgA 抗体産生を増強する効果を評価する系を構築した。今後、B 細胞以外の腸管免疫担当細胞との相互作用を解析する実験系を構築することにより、食品成分の IEC を介した腸管免疫調節機能を、様々な角度から評価することが可能となると考えられる。これらのモデル系を用いて、動物個体に摂取させた際の免疫調節効果との関係、その機能に関与する分子を明らかにすることは、最終的にヒトにおける腸管免疫調節機能の評価系を構築するために重要な情報を与えるものと期待される。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表
特になし。
2. 学会発表
 - 1) Taku Iwamoto, Kiyoshi Yamada, Tetsuro Emoto, Ryo Hatano, Mamoru Totsuka : Establishment and characterization of conditionally immortalized epithelial cells from mouse embryonic intestine. The 19th Annual and International Meeting of the Japanese Association for Animal Cell Technology (JAACT2006) (京都)、2006年9月.
 - 2) 山田潔、岩本拓、江本哲朗、波多野良、戸塚

護:新規マウス小腸上皮細胞株の樹立と免疫学的研究における有用性評価. 日本食品免疫学会 2006 年度大会 (東京)、2006 年 10 月.

- 3) 山崎靖正、山田潔、鎌田啓明、中村吉孝、八村敏志、池上秀二、戸塚護: *Lactobacillus gasseri* OLL2809 の経口投与が経口免疫寛容の誘導および維持に与える影響. 日本食品免疫学会 2006 年度大会 (東京)、2006 年 10 月.
- 4) 土師智寿、山田潔、戸塚護: 特異抗原の経口摂取による CD4⁺小腸上皮内リンパ球における Foxp3 の発現誘導. 日本食品免疫学会 2006 年度大会 (東京)、2006 年 10 月.
- 5) 三枝静江、戸塚護、上野川修一、細井知弘: 非病原性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* および病原性酵母 *Candida albicans* に対する好中球様 HL60 細胞のサイトカイン応答. 日本食品免疫学会 2006 年度大会 (東京)、2006 年 10 月.
- 6) Yukiko Umda, Yoko Akema, Masayuki Kuraoka, Kiyoshi Yamada, Masaaki Hashiguchi, Wataru Ise, Taku Kouro, Yoshimasa Takahashi, Mamoru Totsuka, Kiyoshi Takatsu, Shuichi Kaminogawa, Ryuichiro Sato, Satoshi Hachimura: CD3-IL-2R⁺ Peyer's patch cells respond to poly I:C stimuli and secrete IL-5. 2006 年度第 36 回日本免疫学会総会・学術集会 (大阪)、2006 年 12 月.
- 7) 江本哲朗、山田潔、岩本拓、波多野良、清水誠、戸塚護: 新規マウス大腸上皮細胞株の樹立とその特性の解析. 日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、2007 年 3 月.
- 8) 波多野良、山田 潔、岩本 拓、江本 哲朗、清水 誠、戸塚護: マウス小腸上皮細胞株による腸管免疫系 T 細胞の抗原特異的活性化の解析. 日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、2007 年 3 月.
- 9) 岩本拓、山田潔、波多野良、江本哲朗、清水誠、戸塚護: 癌遺伝子の発現制御可能なマウス小腸上皮細胞株の増殖抑制による成熟型への分化. 日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、2007 年 3 月.
- 10) 山崎靖正、山田潔、中村吉孝、溝上陽子、八村敏志、池上秀二、清水誠、戸塚護: *Lactobacillus gasseri* OLL2809 摂取による経口免疫寛容の強化. 日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、2007 年 3 月.
- 11) 土師智寿、山田潔、溝上陽子、波多野良、清水誠、戸塚護: 特異抗原の経口摂取による腸

管免疫系 CD4⁺T 細胞の制御性 T 細胞機能の変化. 日本農芸化学会 2007 年度大会 (東京)、2007 年 3 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

特になし。

生活習慣病予防効果に対する健康食品等の評価法の検討

分担研究者：池上幸江（大妻女子大学 教授）

研究協力者：青江誠一郎、堀口美恵子（大妻女子大学）

研究要旨

本研究は生活習慣病予防を標榜する健康食品を対象として、その科学的根拠を評価するための方法について検討することとした。とくに広く販売されていると肥満・脂質代謝とがん予防効果に関わる健康食品の評価法の確立とそれらの効果の可能性を明らかにすることとした。なお、がん予防効果を食品では標榜することはできないので、本研究では、採用した方法との関連から、抗変異原性として表記した。

痩身や脂質代謝に対する健康食品素材の有効性は、昨年度に引き続いて2種類の実験動物：KKマウスと成長期ラットを用いて評価する方法についてとくにメタボリックシンドロームとの関係が明らかにされている脂肪組織に対する影響を中心として検討した。その結果、これらの2種類の実験動物は痩身や脂質代謝、あるいはメタボリックシンドロームへの効果を評価する方法として有効であることが示されたが、他方において素材によって結果が異なることも明らかとなり、今後更なる検討が必要であることも示した。我々の研究では、脂肪組織や脂肪細胞に焦点を絞って検討した結果、脂肪組織重量への効果のみならず、脂肪細胞サイズや数への影響を評価できるようにした。また、併せて血清や肝臓脂質への影響と脂質代謝に関与する酵素のmRNAの変動なども組み合わせることによって、それぞれの素材の有効性発現のメカニズムも解明できた。現在いわゆる健康食品では複数の素材を含むものもあり、こうした組合せが逆に有効成分の作用を限弱する例も明らかにした。

他方、いわゆる健康食品素材の抗変異原性については、今年度は抗酸化成分を中心として評価する新たな試験系の検討を行った。評価方法としては、単一細胞レベルにおけるDNA損傷を検出するin vivo コメットアッセイと、マウス肝臓の8-OH dGを検出する方法を小核試験の結果と比較した。用いた健康食品素材は6種の抗酸化成分である。その結果、小核試験と8-OH dGは対象とする細胞が異なるにも関わらず、抗変異原性の結果はよく一致した。他方、コメットアッセイでは検出感度はかならずしも十分ではなかった。小核試験と8-OH dGは人による評価に適応することも可能であるが、今後さらに人での評価法とするには更なる検討が必要である。

A. 研究の目的

本研究は生活習慣病予防を標榜する健康食品を対象として、その科学的根拠を評価するための方法について検討することとした。とくに広く販売されている肥満・脂質代謝とがん予防効果に関わる健康食品の評価法の確立とそれらの効果の可能性を明らかにすることとした。なお、がん予防効果を食品では標榜することはできないので、本研究では、採用した方法との関連から、抗変異原性として表記した。

最近メタボリックシンドロームの概念が提唱され、その原因である肥満の予防が重要視されている。一方で、肥満予防、体脂肪蓄積抑制を標榜または暗示する健康食品が上市されているが、有効性について科学的根拠が明らかではない上に明確な評価法が確立されていない。そこで本研究では、肥満予防効果をメタボリックシンドロームと関連させながら、肝臓ならびに脂肪組織に対する食品成分の関与を評価する方法、指標の検討を実際の食品成分を用いながら検討した。

他方、がんや動脈硬化など様々な疾病の発症や老化には、生体成分の酸化的損傷が関連することが

知られている。一方、生体の酸化的損傷は、抗酸化酵素や抗酸化物質による抗酸化系によって防御されていることから、食品中の抗酸化成分が注目されている。そのため、抗酸化成分を含むいわゆる健康食品が市場に数多く出回っているが、そのような食品の中には科学的根拠が明らかでないものがあることや有効性の評価法が確立されていないなどの問題がある。そこで本研究では、抗変異原性の面から食品成分の有効性を評価する試験系を構築することを目的とし、変異原性試験を応用して実験を行った。

B. 研究方法

1. 肥満・脂質代謝に関与する健康食品成分の有効性の評価

現在市販されている健康食品の中には体脂肪蓄積抑制を標榜しているものが多く、近年のメタボリックシンドロームの概念が後押しして市場が拡大している。しかし、これらの有効性の評価法については明確なものは確立されていない。そこで、本研究では肥満抑制作用の評価を、メタボリックシンドロームへの有効性も考慮した方法で検討することとした。本年度は、昨年評価モデ